



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104628856 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201510035661. 2

(22) 申请日 2015. 01. 23

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院放
射与辐射医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

申请人 北京正旦国际科技有限责任公司

(72) 发明人 宋海峰 高新 钱尼良 张晶
付洁 董立厚 高柳村

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限
公司 11228

代理人 张瑾

(51) Int. Cl.

C07K 16/24(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 37/00(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表9页

(54) 发明名称

一种抗 BLYS 单链抗体及其制备方法和用途

(57) 摘要

本申请属于基因工程抗体领域。本发明提供了一种抗人 B 淋巴细胞刺激因子单链抗体、含有所述抗体的药物组合物和诊断试剂及其用途。所述单链抗体与人 B 淋巴细胞刺激因子具有高亲和力,可用于自身免疫病的治疗和诊断。

1. 一种抗人 B 淋巴细胞刺激因子单链抗体, 其具有选自下列可变区:
 - (a) 重链可变区包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列;
 - (b) 轻链可变区包括 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列;
 - (c) 重链可变区包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列, 且轻链可变区包括 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列;
 - (d) 重链可变区与 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列具有至少 90% 同一性; 或
 - (e) 轻链可变区与 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列具有至少 90% 同一性。
2. 权利要求 1 所述的单链抗体, 其中所述的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4, 且其中所述的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6。
3. 权利要求 2 所述的单链抗体, 其中所述重链可变区的氨基酸序列的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO:3, 所述轻链可变区的氨基酸序列的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO:5。
4. 权利要求 2 所述的单链抗体, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。
5. 权利要求 4 所述的单链抗体, 其氨基酸序列的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO:1。
6. 一种用于治疗自身免疫疾病的药物组合物, 其中包括作为活性成分的权利要求 1 至 5 中任一项所述的单链抗体和药用载体。
7. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的单链抗体在制备用于治疗自身免疫疾病的药物中的用途, 其中所述的自身免疫疾病包括但不限于, 系统性红斑狼疮、肖格伦综合征、类风湿关节炎或重症肌无力等。
8. 一种用于诊断自身免疫疾病的试剂, 其中包括权利要求 1 至 5 中任一项所述的单链抗体、能够产生可检测信号的标记物以及使用说明书。
9. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的单链抗体在制备自身免疫疾病诊断试剂中的用途。
10. 一种抗人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体, 其重链可变区中 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9; 和 / 或其轻链可变区中 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12。

一种抗 BLyS 单链抗体及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,具体涉及抗 B 淋巴细胞刺激因子 (BLyS) 的单链抗体及其制备方法和医药用途。

背景技术

[0002] B 淋巴细胞刺激因子 (B lymphocyte stimulator, BLyS, 也被称为 BAFF) 最早于 1999 年由 Moore 等多个研究小组独立发现的一种全新的、具有重要免疫调节功能的细胞因子。BLyS 属于肿瘤坏死因子 (tumour necrosis factor, TNF) 超家族成员,是一个典型的 II 型跨膜单链糖蛋白。

[0003] BLyS 由 285 个氨基酸组成,分子量大小约为 31.3kDa,其胞外区 134-285 位氨基酸可在弗林蛋白酶的作用下发生水解,形成可溶性的功能片段。虽然 BLyS 能以膜结合的形式存在,但 BLyS 主要以可溶的同源三聚体形式与其受体结合发挥相应的生物学功能。目前发现的 BLyS 受体主要有三个:TACI,BCMA 和 BAFF-R。其中 BLyS 与 BAFF-R 为特异性结合,两者的相互作用是 B 细胞赖以生存的必要条件。

[0004] BLyS 可大量发现于外周血及淋巴组织细胞的培养上清中,其主要表达于诸如中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞等先天固有的免疫细胞中;在 IFN γ 、IL-10 以及 G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 等细胞因子的刺激下会增强 BLyS 的表达。BLyS 具有明显的 B 细胞趋向性并能特异性的结合 B 细胞,其对于 B 细胞的增殖、分化、成熟以及生存等方面发挥着非常重要的调控作用,而 BLyS 对由 B 细胞介导的自身免疫性疾病的过程以及 T 淋巴细胞瘤起着重要的影响。BLyS 过表达与多种自身免疫性疾病有着密切的联系,如系统性红斑狼疮 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)、肖格伦综合征 (Sjogren's Syndrome, SS)、类风湿关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA)、重症肌无力 (Myasthenia Gravis, MG) 等等 (参见,例如,The complexity of the BAFF TNF-family members: implications for autoimmunity. Lahiri A 等 J Autoimmun. 2012 Sep; 39(3):189-98. doi:0.1016/j.jaut.2012.05.009. Epub 2012 Jun 29)。以 BLyS 为作用靶点的药物,尤其以贝利木单抗为代表的单克隆抗体药物等,在治疗 SLE 等自身免疫性疾病方面取得非常好的临床效果。

[0005] 单链抗体 (single chain variable fragment, ScFv) 是通过基因工程将抗体的重链可变区 (variable region of heavy chain, VH) 与轻链可变区 (variable region of light chain, VL) 通过一段连接肽而形成的一种重组蛋白。单链抗体既保持了亲本抗体与抗原的结合特异性和相当的亲和力,因为分子量小更容易进入肿瘤组织和细胞,发挥相应的作用;并且单链抗体不具有完整抗体的 Fc 段,因而其不会与补体受体结合,避免了全长 IgG1 的抗体依赖的细胞毒和补体依赖的细胞毒性。

[0006] 虽然目前噬菌体抗体库为相对最成熟且应用最多的抗体库技术,但是噬菌体抗体库属于原核表达体系,与真核表达体系存在差异,而表达系统差异越大,抗体改构后的活性发生改变的可能性就越大。哺乳动物细胞抗体库属于真核表达体系,它具有原核表达体系

所不具备翻译后修饰功能,而这也是决定蛋白生物活性的关键之一。由于本实验室构建的哺乳动物细胞抗体库是应用人源 293T 细胞建库,因此获得的抗体最近接天然人源抗体,在保证亲和力的同时,也使所获的候选抗体的免疫原性大大降低。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供能抗 B 淋巴细胞刺激因子抗体。

[0008] 本发明提供了一种抗人 B 淋巴细胞刺激因子单链抗体,其具有选自下列可变区:(a) 重链可变区包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列;(b) 轻链可变区包括 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列;(c) 重链可变区包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列,且轻链可变区包括 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列;(d) 重链可变区与 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列具有至少 90% 同一性;或(e) 轻链可变区与 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列具有至少 90% 同一性。

[0009] 因此,目标抗体可能包含 a) 一个重链可变区,其氨基酸序列与序列 4 所示序列至少有约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的一致性和 b) 一个轻链可变区,其氨基酸序列与序列 6 所示序列至少有约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的一致性。

[0010] 在一个优选实施方案中,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:3,轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4。

[0011] 在一个优选实施方案中,编码所述重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列为 SEQ ID NO:1,编码所述轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列为 SEQ ID NO:2。

[0012] 另一方面,本发明提供了具有选自下列可变区的单链抗体:

[0013] (a) 重链可变区的编码基因包括 SEQ ID NO:3 所示核苷酸序列;(b) 轻链可变区的编码基因包括 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列;(c) 重链可变区的编码基因包括 SEQ ID NO:3 所示核苷酸序列,且轻链可变区的编码基因包括 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列;(d) 重链可变区的编码基因能与 SEQ ID NO:3 所示核苷酸序列在严谨条件下杂交;或(e) 轻链可变区的编码基因能与 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列在严谨条件下杂交。

[0014] 一个优选实施方案中,所述单链抗体的重链可变区的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO:3,轻链可变区的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO:5。

[0015] 在一个具体实施方案中,本发明所述单链抗体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2。

[0016] 在一个具体实施方案中,本发明所述单链抗体的编码基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO:2。

[0017] 另一方面,本发明提供了重组表达载体,其中含有编码本发明所述单链抗体全长或可变区的核酸序列。

[0018] 另一方面,本发明提供了宿主细胞,所述宿主细胞被本发明所述的重组表达载体所转化。

[0019] 本发明实验证明,本发明提供的单链抗体与 BlyS 具有高亲和力,BlyS 过表达与多种自身免疫性疾病有着密切的联系,如系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)、肖格伦综合征(Sjogren's Syndrome, SS)、类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)、重症肌无力(Myasthenia Gravis, MG)等。以 BlyS 为作用靶点的药物在治疗 SLE 等自身免疫性疾病方面取得非常好的临床效果。

[0020] 因此,另一方面,本发明提供了一种用于治疗自身免疫病的药物组合物,其包含有效量的作为活性成分的本发明所述的单链抗体和药用载体。

[0021] 术语“有效量”指可有效治疗哺乳动物中的疾病或病症的药物量。

[0022] 术语“药效上可接受的载体”指一种或多种有机或无机成分,它可以使天然的或合成的,与抗体组合后可促进其应用。可接受的载体包括无菌的生理盐水或是其他药学上可获得的且为本领域所熟知的水或非水的等渗溶液或灭菌混悬剂。

[0023] 另一方面,本发明提供了一种针对自身免疫病的诊断试剂,其包含本发明所述的单链抗体、能够产生可检测信号的标记物及使用说明书。

[0024] 另一方面,本发明提供了本发明所述单链抗体在制备用于治疗自身免疫病的药物中的用途。

[0025] 另一方面,本发明提供了本发明所述单链抗体在制备自身免疫病的诊断试剂中的用途。

[0026] 本发明中所述的自身免疫病包括但不限于系统性红斑狼疮、肖格伦综合征、类风湿关节炎或重症肌无力等。

[0027] 本发明所述单链抗体的重链可变区中的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示;轻链可变区中 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 所示。因此,

[0028] 另一方面,本发明提供了一种抗人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体,其重链可变区中 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9;和/或其轻链可变区中 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12。

[0029] 可变区 CDR 的变体与上述 CDR 区可以有至多 6 个氨基酸残基(例如,1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代)的取代,在具有 CDR 变体的单克隆抗体中,CDR 区变体具有与 B 淋巴细胞刺激因子结合活性。

[0030] 本发明所述单克隆抗体除了重链和轻链中的高度可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 和链接序列外,其它为框架区。框架区可在结合所需的三维结构不受影响的条件下被其他序列置换,抗体特异性的分子基础主要来源于它的高变区 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些区域是与抗原结合的关键部位。为维持优选的结合特性,CDR 的序列应尽可能保留,然而,可能需要一些氨基酸改变使结合特性最优化,本领域的技术人员可以用标准做法来达到此目的。

[0031] 所述的单克隆抗体为单链抗体、双链抗体、嵌合抗体、抗体片段或含有所述抗原结合结构域的任何多肽。

[0032] 本发明所述“抗体”应该解释为涵盖具有所需特异性的结合结构域的任何特异性结合因子。因而,这个术语涵盖了与之同源的抗体片段、衍生物以及抗体的功能等同物和同源物,也包括含有抗原结合结构域的任何多肽,无论是天然的还是合成产生的。抗体的实例是免疫球蛋白亚型(如 IgG, IgE, IgM, IgD 和 IgA)及其亚型亚类;也可以是包含抗原结合结构域的片段如 Fab、scFv、Fv、dAb 或 Fd,或者双链抗体。融合至另一多肽的、包含抗原结合结构域的嵌合体分子或者等同物也包括在其中。

[0033] 抗体可以通过许多方式修饰,可用 DNA 重组技术来产生保留原来抗原特异性的其他抗体或嵌合分子。这种技术可以包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补性决定区

(CDRs) 的 DNA 引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。还可以对表达抗体的细胞进行遗传突变或其它改变,这可以改变或者不改变所产生抗体的结合特异性。

[0034] 一旦制得本发明的抗体分子,就可以通过本领域已知的纯化免疫球蛋白分子的任何方法对其进行纯化,例如,通过色谱法(例如,离子交换色谱,亲和色谱,特别是通过蛋白 A 对特异性抗原的亲和色谱和其他柱色谱)、离心、利用溶解度差异,或通过任何其它纯化蛋白质的标准技术。在许多实施方案中,抗体从细胞分泌到培养基中,通过收集培养基并进行纯化得到抗体。

[0035] 除另有说明外,本申请中的所有科技术语的都具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解相同的含义。尽管与本申请中描述类似或等同的方法及材料都可用于实施或检验本发明,但是下文仍还是对合适的方法和材料进行了描述。本申请中引用的全部出版物、专利申请、专利及其他参考文献其全部内容在此引入作为参考。如有抵触,包括定义,以本申请为准。

[0036] 下列实施例旨在进一步举例说明实现本发明的具体方式,而决不构成对本发明的限制。本领域技术人员应该理解的是,在不违背本发明的精神和原则的前提下,对本发明进行改动得到的技术方案都将落入本发明的待批权利要求范围内。

实施例

[0037] 在本申请中,如无特别说明,本发明的实施都使用分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,这些技术都是本领域技术人员所掌握的。这些技术在本领域技术人员常用文献中有详细地描述,例如 Sambrook 等人编著的 *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 第三版等。

[0038] 实施例 1 :抗人 BlyS ScFv 抗体的筛选

[0039] 1.1 抗原制备。首先通过基因重组技术制备 BlyS 蛋白。将编码 BlyS 蛋白的 DNA 序列 (GenBank:AF132600.1) 克隆入的载体 p3457-his 中,瞬时转染入 293E 细胞株,经过三天培养,收集上清液,以 Ni 亲和柱 (GE) 纯化并收集 BlyS 蛋白。将纯化的 BlyS 蛋白进行 FITC 荧光蛋白标记 (武汉优尔生)

[0040] 1.2 筛选。用 1.1 制备的 FITC 荧光标记的 BlyS 蛋白对 293T 细胞人源抗体库进行筛选。每轮筛选均于转染前 24h 对 293T 细胞进行传代并计数,确保其细胞存活率 $\geq 95\%$ 。其中每 100mm 培养皿接入细胞数为 $2-4 \times 10^6$ 个细胞,加入培养基 8ml 后培养 24h。每皿加入的质粒为 12 μ g,与 12 μ l 的 PEI (浓度为 3mg/ml) 以及 900 μ l 的 DMEM 混合振荡并静置 15min 后加入培养皿中。培养 60-72h 后以无酶细胞分离液消化细胞并收集,以 $1 \times$ PBS 缓冲液轻轻吹洗细胞,重悬后计数。将细胞与 FITC 标记的 BlyS 抗原于 37°C 共孵育 1h,并以 $1 \times$ PBS 轻轻洗涤 2-3 次。将与抗原孵育后的细胞重悬于 1ml 的 $1 \times$ PBS 缓冲液中,以流式细胞术分选出荧光 (FITC) 强度最强、占细胞总数为 0.1% 的细胞。分选获得的细胞收集于约 400 μ l 的 $1 \times$ PBS 缓冲液中,并于 850rpm 离心 5min。用移液器小心吸去上清,按照试剂盒说明书提取细胞中的质粒。所提质粒转化 DH5 α ,一部分铺板并进行 PCR 鉴定;另一部分则培养后保存作为下一轮筛选的抗体库。第一轮以哺乳动物细胞展示型人源 ScFv 抗体库为起始文库,三轮筛选的抗原浓度依次为 1 μ g/ 10^6 cells、0.1 μ g/ 10^6 cells 及 0.01 μ g/ 10^6 cells。第三轮筛选结束后所获得的质粒转化 DH5 α 后全部涂板,挑选全部单菌落做菌液 PCR,选取阳性结

果送测序。测得的全长 scFv 核苷酸序列如 SEQ ID NO :1 所示,其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。其中重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO :3,编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO :4 ;轻链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO :5,编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO :6。经与 IgBlast 数据库比对,分析获得氨基酸序列,进一步比对 CDR 区推断出重链 CDR1 氨基酸序列为 GFTFSRYW (SEQ ID NO :7),重链 CDR2 氨基酸序列为 INTDGSST (SEQ ID NO :8),重链 CDR3 氨基酸序列为 ARDQDGVGATHDY (SEQ ID NO :9);轻链 CDR1 氨基酸序列为 HSVGSN (SEQ ID NO :10),轻链 CDR2 氨基酸序列为 GAS (SEQ ID NO :11),轻链 CDR3 氨基酸序列为 QQYGSSP (SEQ ID NO :12)。

[0041] 实施例 2 :分泌型真核表达载体的构建与鉴定

[0042] 2.1 目的基因的扩增。设计引物对获得候选的 11 号 ScFv 序列进行 PCR 扩增。其中上游引物为 B-11F :5' -GTACGCTCTTCATGTCAGGTCCAGCTGGTGAAAC-3' ;下游引物为 B-11R :5' -GATCGCTCTTCTAGCTCCTTGGCCGAACGTCCACG-3'。其中在引物中引入了酶切位点 BspQI (序列中划线部分)。PCR 流程为 :95℃ 10min ;95℃ 30s ;56℃ 1min ;72℃ 1min ;共 35 个循环 ;72℃ 延伸 10min。PCR 产物以琼脂糖凝胶电泳鉴定回收。

[0043] 2.2 重组质粒的构建与鉴定。扩增的 B11ScFv 与载体 p3457his 进行普通的酶切酶连构建重组质粒 p3457B-11ScFv。重组质粒转化至 DH5 α 中,涂布含有 100 μ g/ml 的氨苄青霉素的 LB 平板。37℃ 过夜培养后随机挑选其中的阳性菌落,37℃ 摇菌 5h 后,以 ScFv 基因的上下游特异性引物对菌液进行 PCR 鉴定。菌液 PCR 结果在 750 处有一单一条带,与 ScFv 大小相符。在 B-11ScFv 插入载体的上下游找到两个不同的单一酶切位点,其中上游为 SalI,下游为 NotI,以相应的内切酶进行酶切鉴定。

[0044] 实施例 3 :抗 BlyS 单链抗体 B-11ScFv 的表达、纯化与鉴定

[0045] 稳定传代的 293E 悬浮细胞于转染前 24h 进行传代并计数,其中细胞密度为 0.7-0.9 $\times 10^6$ /ml,培养体积为 30ml。培养 24h 后进行瞬时转染。每毫升培养体积加入 1 μ g 质粒,转染采用 PEI 介导,质粒与 PEI 的质量比为 1:3。其中。取培养体积 10% 的培养基,依次加入质粒与 PEI 后迅速振荡混匀,室温静置 15min 后转染 293E 细胞中。37℃ CO₂ 培养箱中培养 72h 后收取细胞上清。以镍亲和柱纯化抗体蛋白并以 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定。电泳结果显示在约 30kDa 处有条带,与预期相符。在 Western-blotting 中,将凝胶结果转移到膜上并以 5% 的脱脂牛奶封闭 1h。将膜与 HRP 标价的山羊抗 His 标签的抗体共孵育 1h 并以 TBST 缓冲液清洗,最后以显色液显色后检测。结果显示,在约 30kDa 处有目的条带,表明该抗体能与抗 His 的抗体特异性结合。

[0046] 实施例 4 :FortieBio 测定 B-11scFv 抗体亲和力常数

[0047] 以 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液稀释生物素化的抗原 BlyS 至 20 μ g/ml,并加入到第 2 列中,每孔 200 μ l ;以 PBS 缓冲液 2 倍梯度稀释 B-11ScFv 抗体蛋白并加入到第 4 列的 A-F 孔中,其浓度分别为 25 μ g/ml,12.5 μ g/ml,6.25 μ g/ml,3.125 μ g/ml,1.5625 μ g/ml,0.78125 μ g/ml,以 PBS 稀释贝利木单抗至 50 μ g/ml 作为阳性对照,加入至第 4 列的 G 孔中,每孔均加入 200 μ l ;第 1 列、第 3 列所有的孔以及第 4 列的 H 孔均加入 PBS 缓冲液,每孔 200 μ l。将加好样的 96 孔板放入 FortieBio 仪器中检测。测定结果为 B-11scFv 抗体的亲和力常数为 :3.08nM,表明本发明制备的 scFv 与 BlyS 具有较高的亲和力,与文献报导的完整抗体相当。

序列表

<110> 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所

<120> 一种抗 BlyS 单链抗体及其制备方法和用途

<130>

<160> 12

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 714

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> ScFv 抗体核苷酸序列

<222> (1)..(714)

<400> 1

gaggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttagttcagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agatattgga tgctctgggt ccgccaagct 120

ccagggaagg ggctggtgtg ggtctcacgt attaatactg atgggagtag cacatggtac 180

gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtat actactgtgc cagagatcag 300

gatggagtgg gagctacca tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360

ggtggtggtg gatcaggtgg aggaggttct ggaggtggtg gatccgatat ttggatgacc 420

cagtctccag ccaccctgtc tgtgtctcca ggggaaaggg ccaccctctc ctgcagggcc 480

agtcacagtg ttggcagcaa cttagcctgg ttccagcaga gacctggcca ggctcccagg 540
ctcctcatct atggtgcate caccagggcc actggtatcc cagccagggtt cagtggcagt 600
gggtctggga cagagttcac tctcaccate agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtt 660
tattactgtc agcagtatgg tagctcacct gggacttttg gccagggacc aagg 714

<210> 2

<211> 237

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> ScFv 抗体氨基酸序列

<222> (1).. (237)

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asn Thr Asp Gly Ser Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Gln Asp Gly Val Gly Ala Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ala			
	130	135	140
Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala			
	145	150	155
		160	
Ser His Ser Val Gly Ser Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly			
	165	170	175
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly			
	180	185	190
Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu			
	195	200	205
Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln			
	210	215	220

Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gly Thr Phe Gly Gln Gly Pro
225 230 235

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

<213> 人源序列

<220>

<221> 重链可变区核苷酸序列

<222> (1)..(360)

<400> 3

gaggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttagttcagc ctgggggggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agatattgga tgctctgggt ccgccaagct 120

ccagggaagg ggctggtgtg ggtctcacgt attaatactg atgggagtag cacatggtac 180

gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatac acagtctgag agccgaggac acggctgtat actactgtgc cagagatcag 300

gatggagtgg gagctacca tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> 人源序列

<220>

<221> 重链可变区

<222> (1)..(120)

<400> 4

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Asn Thr Asp Gly Ser Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Gln Asp Gly Val Gly Ala Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 309

<212> DNA

<213> 人源序列

<220>

<221> 轻链可变区核苷酸序列

<222> (1)..(309)

<400> 5

gatatttgga tgaccagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagggccacc 60

ctctcctgca gggccagtc cagtgttggc agcaacttag cctggttcca gcagagacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag actggagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tatggtagct cacctgggac ttttggccag 300

ggaccaagg 309

<210> 6

<211> 103

<212> PRT

<213> 人源序列

<220>

<221> 轻链可变区

<222> (1)..(103)

<400> 6

Asp Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ser Val Gly Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gly
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Pro Arg
100

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人源序列

<220>

<221> 重链可变区 CDR1

<222> (1)..(8)

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人源序列

<220>

<221> 重链可变区 CDR2

<222> (1).. (8)

<400> 8

Ile Asn Thr Asp Gly Ser Ser Thr

1 5

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> 人源序列

<220>

<221> 重链可变区 CDR3

<222> (1).. (13)

<400> 9

Ala Arg Asp Gln Asp Gly Val Gly Ala Thr His Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人源序列

<220>

<221> 轻链可变区 CDR1

<222> (1).. (6)

<400> 10

His Ser Val Gly Ser Asn
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> 人源序列

<220>
<221> 轻链可变区 CDR2
<222> (1).. (3)

<400> 11

Gly Ala Ser
1

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人源序列

<220>
<221> 轻链可变区 CDR3
<222> (1).. (7)

<400> 12

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
1 5

专利名称(译)	一种抗BLyS单链抗体及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN104628856A	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201510035661.2	申请日	2015-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京正旦国际科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京正旦国际科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京正旦国际科技有限责任公司		
[标]发明人	宋海峰 高新 钱尼良 张晶 付洁 董立厚 高柳村		
发明人	宋海峰 高新 钱尼良 张晶 付洁 董立厚 高柳村		
IPC分类号	C07K16/24 A61K39/395 A61P37/00 G01N33/533		
代理人(译)	张瑾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请属于基因工程抗体领域。本发明提供了一种抗人B淋巴细胞刺激因子单链抗体、含有所述抗体的药物组合物和诊断试剂及其用途。所述单链抗体与人B淋巴细胞刺激因子具有高亲和力，可用于自身免疫病的治疗和诊断。